

ヒト大腸非腫瘍・腫瘍組織におけるテロメラーゼ活性とその組織学的分布に関する検討

著者	千田 正樹
号	1531
発行年	1999
URL	http://hdl.handle.net/10097/21762

氏 名（本籍） ち だ まさ き
千 田 正 樹

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 博 第 1 5 3 1 号

学位授与年月日 平 成 11 年 3 月 25 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科 専 攻 東北大学大学院医学系研究科
（博士課程）内科学系専攻

学 位 論 文 題 目 Telomerase activity and its histological localization in human colorectal non tumorous and tumorous tissues.

（ヒト大腸非腫瘍・腫瘍組織におけるテロメラーゼ活性とその組織学的分布に関する検討）

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教授 豊 田 隆 謙 教授 小 野 哲 也

教授 堀 井 明

論 文 内 容 要 旨

研 究 目 的

テロメアは染色体末端構造物で、一細胞分裂毎に短縮していくことが知られており、細胞不死化あるいは分裂寿命の延長にはこのテロメア長の維持機構が必要である。テロメラゼはこのテロメア長維持機構の一つで、*de novo*でテロメアを伸長させる酵素（リボヌクレオ蛋白）であり、ほとんどの不死化細胞で発現がみられ正常体細胞ではごく一部を除いて発現がみられない。消化管組織においては、比較的細胞分裂回数の多い上皮細胞、クローナルな増殖を示すリンパ系細胞が存在し、テロメラゼの発現が予想される。そこで大腸におけるテロメラゼ活性及びテロメラゼ酵素の key component である *hTERT* (telomerase reverse transcriptase) 遺伝子発現の局在について検討した。

研 究 方 法

テロメラゼ活性は PCR を介した高感度測定法 TRAP (telomeric repeat amplification protocol) 法を一部変更して検討した。また内部標準をおき、陽性対照・検体の RNase 処理・陰性対照を同時に検討することにより方法の特異性を確認した。対象として健常部大腸粘膜、腸間膜リンパ節、大腸腺腫、大腸腺腫内癌、大腸進行癌を、健常部大腸粘膜や腸間膜リンパ節についてはさらに、分離精製した腺管、lamina propria mononuclear cell (LPMC)、リンパ節リンパ球を測定した。テロメラゼ活性の発現の有無を決定していると考えられている *hTERT* 遺伝子発現の局在を確認するため、*in situ* mRNA ハイブリダイゼーションを行った。*in situ* ハイブリダイゼーションのプロープは *hTERT* 遺伝子に特異的配列部位 (T 領域) を選び、549bp 長の断片を用いた。TRAP 法で陽性と確認された進行大腸癌を陽性対照とし、1) センスプロープ・アンチセンスプロープでの比較、2) 非標識アンチセンスプロープで標識アンチセンスプロープのシグナルをブロックできること、3) *hTERT* 遺伝子以外の遺伝子の非標識アンチセンスプロープではブロックできないことから検出されたシグナルの特異性を確認した。

研 究 結 果

TRAP 法では、健常部大腸粘膜 10 例、大腸腺腫 14 例で全例テロメラゼ活性陰性、腺腫内癌では 60% (3/5 例) 陽性であった。しかし健常大腸粘膜より腺管 (crypt) を分離精製し測定すると、4 例全例で陽性であり、正常体細胞の中でも比較的分裂回数の多い大腸腺管でテロメラゼ活性が発現していることが確認された。リンパ球系の検討では、LPMC は 4 例全例陰性、腸

間膜リンパ節リンパ球7例の検討では全組織でテロメラーゼ活性中等度から強陽性を認め（1例のぞき）分画上是非B細胞と比較し、B細胞で数倍から10倍以上の活性を認めた。これらは同じ単核球でも腸間膜リンパ節、とくにB細胞がクローナルな増殖をする場であり、これに対し、LPMCは腸間膜リンパ節リンパ球と比較し、様々な分化度・機能を持つ多種・多様な単核球であり両者の性格上の違いからでた結果と考えられた。他に大腸癌での検討では93%（53/57例）テロメラーゼ活性陽性であった。

in situ mRNA ハイブリダイゼーションの結果は大腸癌5例中5例で癌細胞に一致してシグナル陽性であり、TRAP法で検出したテロメラーゼ活性は癌細胞由来であることが確認された。また一部のリンパ濾胞において陽性であったが、健常大腸粘膜5例において上皮細胞すべてでシグナル陰性。大腸腺腫5例も全例シグナル陰性であった。

結 論

一部変更したTRAP法で、テロメラーゼ活性を特異的に検出していることを確認した。また、*in situ* mRNA ハイブリダイゼーション法にて *hTERT* 遺伝子 mRNA 特異的シグナルを検出した。健常大腸においては、TRAP法で大腸分離腺管と腸間膜リンパ節リンパ球（主にB細胞）でテロメラーゼ活性を認めた。*in situ* mRNA ハイブリダイゼーション法では、粘膜内リンパ濾胞で *hTERT* 遺伝子の発現を確認した。また同方法にて、大腸癌組織では癌細胞に一致して *hTERT* 遺伝子の発現を確認した。

審 査 結 果 の 要 旨

テロメアは染色体末端構造物で、一細胞分裂毎に短縮していくことが知られており、細胞不死化あるいは分裂寿命の延長にはこのテロメア長の維持機構が必要である。テロメラーゼはこのテロメア長維持機構の一つで、*de novo*でテロメアを伸長させる酵素（リボヌクレオ蛋白）であり、ほとんどの不死化細胞で発現がみられ正常体細胞ではごく一部を除いて発現がみられない。このことから、テロメラーゼは癌の診断マーカーとして、また癌治療の標的として注目されている。しかしこれまでその発現の局在は不明確であり、癌の診断マーカーとして考えた場合、大腸癌組織の中で癌細胞に一致してテロメラーゼ活性が発現しているのかどうか、健常大腸組織に発現が見られないのかどうか、良性腫瘍において発現が消化管組織において見られないのかどうかが重要な問題となる。一方健常体細胞でも細胞分裂能力の高い幹細胞については、テロメア長維持機構としてテロメラーゼが働いていることが示唆されてきている。消化管組織においては、比較的細胞分裂回数の多い上皮細胞、クローナルな増殖を示すリンパ系細胞が存在し、テロメラーゼの発現が予想されるが、これまで充分には検討されていない。最近テロメラーゼ活性とその構成成分である *hTERT* (telomerase reverse transcriptase) の遺伝子発現に有意な相関が報告され、*hTERT* 遺伝子発現の有無がテロメラーゼ活性発現の有無を決定していると考えられている。

本研究では、健常体細胞である健常大腸腺管、腸間膜リンパ節リンパ球についてテロメラーゼ活性を検討し、健常大腸組織、大腸腺腫、大腸癌組織について *hTERT* 遺伝子発現の検討をし、次のことを明らかにした。

(1) 健常大腸において腺管でテロメラーゼ活性を確認した。(2) 腸間膜リンパ節リンパ球、特に B 細胞でテロメラーゼ活性を確認した。(3) *in situ* ハイブリダイゼーションにおいて粘膜内リンパ濾胞で *hTERT* 遺伝子発現を確認した。(4) また同方法で大腸癌細胞に一致して *hTERT* 遺伝子発現を確認するとともに、そのシグナルの強さは健常部大腸上皮細胞や粘膜内リンパ濾胞に比較し明らかに強いことを確認した。

以上本研究は、健常大腸腺管、また腸間膜リンパ節リンパ球、特に B 細胞でテロメラーゼ活性を確認したことにより、健常組織でもクローナルな増殖のためにテロメラーゼ活性が発現していることが考えられること、またテロメラーゼを癌治療の標的と考えた場合その副作用を知る上で有用であること、一方大腸癌細胞に一致して強い *hTERT* 遺伝子発現を認めたことより、テロメラーゼが大腸癌の診断マーカーとなりうる潜在能力を持っていることを示唆した研究であり、今後の癌診療での本研究成果の果たす役割は大きいといえる。従って、本論文は学位に充分、値するものと思われる。